

SIMULTANEOUS EXPRESSION OF TWO KINDS OF INSECTICIDAL PROTEINS

Publication number: JP1104177 (A)

Publication date: 1989-04-21

Inventor(s): OITA KENJI; NISHIOKA RIKI; OSHIE KAZUYUKI; SHIMIZU MASATOSHI; NAKAMURA KEIKO; TAKADA YASUSHI; MIKITANI KENICHI; OKAWA HIDEO

Applicant(s): SUMITOMO CHEMICAL CO

Classification:

- international: C12N15/09; C07K14/325; C12N1/20; C12N15/00; C12P21/02; C12R1/07; C12R1/19; C12N15/09; C07K14/195; C12N1/20; C12N15/00; C12P21/02; (IPC1-7): C12N1/20; C12N15/00; C12P21/02

- European: C07K14/325

Application number: JP19870319288 19871216

Priority number(s): JP19870319288 19871216; JP19870171913 19870708

Abstract of JP 1104177 (A)

PURPOSE: To produce two kinds of insecticidal proteins in large quantities at the same time, by forming a gene containing structural genes coding two kinds of insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* aizawai IPL strain connected in series in the same direction. **CONSTITUTION:** A manifestation plasmid containing a gene composed of structural genes coding two kinds of proteins of *Bacillus thuringiensis* aizawai IPL strain having prescribed amino acid sequence, wherein said genes are connected in series in the same direction. The manifestation plasmid can manifest said gene in a microbial cell. A microorganism transformed with the manifestation plasmid and capable of producing insecticidal proteins is cultured to obtain the objective insecticidal proteins.; The insecticidal protein gene to be used in the above process is preferably 130KDa insecticidal protein gene exhibiting strong insecticidal activity against diamondback moth and common cutworm.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

⑫ 公開特許公報(A) 平1-104177

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)4月21日

C 12 N 15/00

A-8412-4B

1/20

8515-4B

C 12 P 21/02

C-6712-4B ※審査請求 未請求 発明の数 3 (全20頁)

⑭ 発明の名称 2種の殺虫蛋白の同時発現

⑰ 特 願 昭62-319288

⑱ 出 願 昭62(1987)12月16日

優先権主張 ⑲ 昭62(1987)7月8日 ⑳ 日本(JP) ㉑ 特願 昭62-171913

⑳ 発 明 者 大 江 田 憲 治 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

㉒ 発 明 者 西 岡 里 佳 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

㉓ 発 明 者 押 柄 和 幸 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内

㉔ 出 願 人 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市東区北浜5丁目15番地

㉕ 代 理 人 弁理士 諸 石 光 熙 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

2種の殺虫蛋白の同時発現

2. 特許請求の範囲

(1) 第1図及び第2図に記載のアミノ酸配列で特

定されるパチラス・チュリンゲンシス・アイザワ

イ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝

子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを

微生物固体内で発現させる発現プラスミド

(2) 第1図記載の塩基配列(塩基番号1~3465)

及び第2図に記載の塩基配列(塩基番号1~

3528)で特定されるパチラス・チュリンゲンシス

・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードす

る構造遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを

微生物固体内で発現させることを特徴

とする特許請求の範囲第1項記載の発現プラスミ

ド

(3) パチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I

PL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子

の各々の5'及び3'末端側にそれぞれ lacプロモ-

ーターおよびrrnBターミネーターを保持する遺伝子

カートリッジを直列に同方向に接続した遺伝子を

含みこれを微生物固体内で発現させることを特徴

とする特許請求の範囲第1項および第2項記載の

発現プラスミド。

(4) 発現プラスミド pKCB1 で特定される特許請求

の範囲第1項記載の発現プラスミド

(5) 発現プラスミド pTBK5 で特定される特許請求

の範囲第3項記載の発現プラスミド

(6) 第1図及び第2図に記載のアミノ酸配列で特

定されるパチラス・チュリンゲンシス・アイザワ

イ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝

子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを

微生物固体内で発現させる発現プラスミドにより

形質転換され殺虫蛋白を生産する微生物

(7) 第1図記載の塩基配列(塩基番号1~3465)

及び第2図に記載の塩基配列(塩基番号1~

3528)で特定されるパチラス・チュリンゲンシス

・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードす

る構造遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産することを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の微生物

(8) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子の各々の5'及び3'末端側にそれぞれ lacプロモーターおよびrrnBターミネーターを保持する遺伝子カートリッジを直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産することを特徴とする特許請求の範囲第6項および第7項記載の微生物。

(9) 発現プラスミドpXCB1を保持する特許請求の範囲第6項記載の微生物

(10) 発現プラスミドpTBKC5を保持する特許請求の範囲第8項記載の微生物。

(11) 第1図及び第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝

子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産することを特徴とする特許請求の範囲第11項および第12項記載の殺虫蛋白の製造方法。

(14) 発現プラスミドpXCB1を保持する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第11項記載の製造方法

(15) 発現プラスミドpTBKC5を保持する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第13項記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の2種の殺虫蛋白遺伝子を含みこれを宿主内で同時に発現させる発現プラスミド、該プラスミドを保持しバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の殺虫蛋白を生産する微生物および該微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法に関する。

さらに詳しくは、本発明は、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の2種の殺虫蛋白遺伝子のうち特に鱗翅目昆虫であるコナガ、ハスモ

子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産する微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法

(12) 遺伝子が第1図記載の塩基配列(塩基番号1~3465)及び第2図に記載の塩基配列(塩基番号1~3528)で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第11項記載の殺虫蛋白の製造方法

(13) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子の各々の5'及び3'末端側にそれぞれ lacプロモーター及びrrnBターミネーターを保持する遺伝子カートリッジを直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産する微生物

を宿主内で発現させる発現プラスミド、該プラスミドを保持しバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の殺虫蛋白を生産する微生物および該微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法に関する。

従来技術

バチラス・チュリンゲンシスの各種菌株は、胞子形成期に殺虫蛋白からなる1~2 μ mに及び結晶を形成し、この結晶蛋白を摂食した鱗翅目害虫は、摂食活動を停止し、腸管破裂等ののち、死に至ることが知られている。バチラス・チュリンゲンシス株は、鞭毛抗原やエステラーゼ活性などにより29亜種に分類されており、各々の菌株は特異的、かつそれぞれ異なる殺虫活性を示す。各種菌株の中から防除目的の害虫に対して最も有効な菌

株を選定し、それを培養することによって菌体内に殺虫蛋白を作らせ、殺虫蛋白、胞子及び菌体残渣を含む懸濁液にタルク等を混合することにより製剤を調製し、それを殺虫剤として用いる。

問題解決の手段

本発明者らは、遺伝子工学的手法を用いて殺虫スペクトルの広いバチラス・チューリンゲンシス殺虫蛋白製剤を生産することを目的とし、公知の菌バチラス・チューリンゲンシス・アイザワイ IPL株の保持する2種の異なる殺虫活性を有する殺虫蛋白遺伝子について研究を重ねた結果、特にコナガ、ハスモンヨトウに対し強い殺虫活性を示す130KDaの殺虫蛋白（以下130KDa殺虫蛋白と呼ぶ）及びカイコに対し強い殺虫活性を示す135KDaの殺虫蛋白（以下135KDa殺虫蛋白と呼ぶ）の両殺虫蛋白遺伝子を微生物菌体内で同時に発現させる発現用プラスミド及び該プラスミドを保持し両殺虫蛋白を生産する微生物を創製し、この微生物を培養することにより、異なる殺虫活性を有する2つの殺虫蛋白を同時に、大量生産する製造方法を完成した。

蛋白遺伝子カートリッジを含む発現プラスミド pKC6 (ATCC 67487) に130KDa殺虫蛋白遺伝子を同方向に挿入し接続することにより得られた2種殺虫蛋白同時発現プラスミド pKC81 を挙げることができる。

また、構造遺伝子の前後にプロモーター及びターミネーターを保持する2種の殺虫蛋白遺伝子カートリッジの接続による2種の殺虫蛋白同時発現用プラスミドの例として、発現プラスミド pTB1 (特開昭62-181784に従い、バチラス・チューリンゲンシス・アイザワイ IPL No.7 株 (FERM BP-1150) より構築できる) 由来の130KDa殺虫蛋白遺伝子カートリッジと発現プラスミド pKC6 (ATCC 67487) 由来の135KDa殺虫蛋白遺伝子カートリッジの接続により得られた発現プラスミド pTBKC5 を挙げることができる。

該技術を用い同一の殺虫蛋白遺伝子を直列に接続し、プラスミド上の殺虫蛋白遺伝子のコピー数を倍化することができ、このことにより殺虫蛋白の生産を増大させることも可能である。

本発明に用いる殺虫蛋白遺伝子は特にコナガ、ハスモンヨトウに対し強い殺虫活性を示す130KDa殺虫蛋白遺伝子 (特開昭62-100292) 及びカイコに対し強い殺虫活性を示す135KDa殺虫蛋白遺伝子 (特開昭61-193483) である。本発明の2種の殺虫蛋白同時発現用プラスミドは、プロモーター及びターミネーターを保持する一方の殺虫蛋白遺伝子カートリッジの構造遺伝子の上流または下流に他の殺虫蛋白遺伝子を直列に同方向に挿入し、接続することにより製造することができる。ここで挿入する方の殺虫蛋白遺伝子は殺虫蛋白構造遺伝子のみの場合、上流にプロモーターおよびSD領域を有する遺伝子の場合あるいは上流にSD領域を有する遺伝子の場合のいずれでもよい。さらに、2種の殺虫蛋白につき、各々プロモーター及びターミネーターを保持する殺虫蛋白遺伝子カートリッジを製造し、カートリッジとカートリッジを直列に同方向に接続することによっても製造できる。この例として、バチラス・チューリンゲンシス・アイザワイ IPL株の135KDa殺虫

遺伝子組換え技術によれば基本となるDNAの特定の部位に、該DNAがコードする蛋白の基本的な特性を変化させることなく、あるいは改善するように、人為的に変異をおこすことができる。本発明により提供される、天然の塩基配列を有する遺伝子DNAあるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子DNAに関しても同様に人為的に塩基の欠失、付加、置換などを行うことにより天然の遺伝子と同等あるいは改善された特性とすることが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子をも含むものである。

本発明のバチラス・チューリンゲンシスの直列に接続された2種の殺虫蛋白遺伝子の発現のプロモーターおよびターミネーターとしては、発現ベクター pUC18 (ファルマシア社) の lac プロモーター、発現ベクター pKK223-4 (特開昭60-242528) の tac プロモーター、rrnB リボソーム RNA ターミネーター、発現ベクター pDR720 (ファルマシア社) の lrp プロモーターあるいは誘導可能な発現ベクター pPL.lanbda (ファルマシア社) の PL プロモーター

ーなどを用いることができる。

本発明の2種殺虫蛋白の同時発現プラスミドを、例えば大腸菌 JM109株（ファルマシア社）等の宿主微生物へ導入することにより菌体内で2種の殺虫蛋白を同時発現する微生物を得ることができる。

この様にして製造された形質転換微生物を、適当な培地、条件で培養することにより、2種の殺虫蛋白を同時生産することが可能である。培養後の殺虫蛋白の単離は、例えば菌体を超音波で破碎し、遠心分離を行って、該殺虫蛋白の凝集体を容易に濃縮、回収することにより行うことができる。

また、大腸菌の宿主-ベクター系のみならず、枯草菌、酵母、シュードモナス菌、あるいは放線菌等の宿主-ベクター系も利用可能であり、それぞれの宿主-ベクター系の特徴を生かした殺虫蛋白の大量生産が行える。

以下に実施例を挙げ本発明を詳細に説明する。本発明は、以下の実施例のみに限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更をすることができる。

HgCl₂, 1 mM 2-メルカプトエタノール, 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM dGTP, 50 μM TTP] 中で37℃で60分間反応した。反応後、常法に従い、クロロホルム-フェノール処理、エタノール沈澱を行い DNAを回収し、10 μLの滅菌蒸留水に懸濁した。得られた DNA溶液 5 μLに、Bam HIリンカー（宝酒造）1 μLを加え、DNAライゲーションキット（宝酒造）A液40 μL及び同B液を加えて攪拌し、16℃1時間反応した。その後、Cohenらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110-2114)に従い、反応液を大腸菌 JM103株（ファルマシア社）に形質転換した。出現したアンピリシン耐性のコロニーを培養し、Birnboimらの方法(Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523)に従いプラスミド DNAを調製した。約1 μgのプラスミド DNAに、3ユニットの制限酵素Bam HIを加え、20 μLのHI反応液（前述）中で37℃、1時間反応し、アガロースゲル電気泳動で分析した。約2.4Kb及び3.8Kbの2本のBam HI断片を持つプラスミドを選択し、これを pAB11とした。（第4図）

実施例1.

1. 2種の殺虫蛋白の同時発現用プラスミド pKCBIの構築

ステップ1: プラスミド pAB11の構築

約5 μgの130KDaの殺虫蛋白遺伝子発現用プラスミド pAB8（特開昭62-181784）に20ユニットの制限酵素 Hde Iを加え、200 μLのHigh反応液（50 mM トリス・塩酸 (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ジチオスレイトール）中で37℃1時間反応後、反応液に等量のクロロホルム・フェノール(1:1) 混液を加え、混合し、10,000rpmで5分間遠心した。上層を分取した後、1/50容の5 M NaCl及び2容のエタノールを加えて-80℃に15分間放置することにより DNAをエタノール沈澱した後、10,000 rpmで10分間遠心して DNAを回収し、10 μLの滅菌蒸留水に懸濁した。以下、反応後のDNAの回収は上述の方法に従い、実施した。得られた DNA溶液 5 μLに10ユニットの大腸菌 DNAポリメラーゼ・クレノー断片を加え、20 μLのポリメラーゼ反応液（50 mM リン酸カルシウム, 5 mM

ステップ2: 2種の殺虫蛋白の同時発現用プラスミド pKCB1の構築

135KDa殺虫蛋白遺伝子の発現用プラスミド pKCG（特開昭61-193483 にかかる寄託微生物 *E. coli* JM103/pKCG(ATCC 67487)から得られる）の約5 μg に対し、20ユニットの制限酵素Bam HIを加え、200 μLのHigh反応液中で37℃、1時間反応し、常法に従い DNAを回収し、10 μLの滅菌蒸留水に懸濁した。10 μLの DNA溶液に5ユニットのアルカリホスファターゼ（宝酒造）を加え、ホスファターゼ反応液中で60℃1時間反応後、常法のフェノール-クロロホルム処理を2回行った後、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、10 μLの滅菌蒸留水に懸濁した。つぎに、約5 μgのプラスミド pAB11に制限酵素Bam HIを加え、200 μL Highの反応液中で37℃、1時間反応後、反応後を常法に従い臭化エチジウムを含む0.8%の低融点アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。常法に従い、紫外線ランプ下で、3.8Kbの DNA断片に相当するバンドを切り出し、ゲルを融解した。さらに

フェノール処理を行い、DNAをエタノール沈澱により回収し、10 μ l の滅菌蒸留水に懸濁した。このようにして調製した約1 μ g の Bam HI 切断済みのプラスミド pKC6 と約1 μ g の 3.8Kb の Bam HI DNA断片を混合し、全容10 μ l とし、DNAライゲーションキット（宝酒造）A液40 μ l 及び同B液5 μ l を加えて攪拌し、16℃で1時間反応した。その後、反応液5 μ l を大腸菌 JM109株コンピテントセル（宝酒造）100 μ l と混合後、0℃で30分放置した後42℃で2分間熱処理した。この溶液に900 μ l の LBプロス培地（1 l の蒸留水に対し、10gのトリプトン（ディフコ社）、5gのイーストエキストラクト（ディフコ社）、5gのNaClを含む培地）を加え、37℃で1時間インキュベート後、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LBプロス寒天培地（LBプロス液体培地1 l に対して12gの寒天を含む。）にプレートした。出現したアンピシリン耐性のコロニーを培養し、Birnboimらの方法に従いプラスミド DNAを調製した。約1 μ g のプラスミド DNAに3ユニットの制限酵素 Bam HI を加え、20

μ l の High反応液中で37℃、1時間反応し、アガロースゲル電気泳動で分析した。インサート DNAとして3.8Kb の Bam HI断片を持つプラスミドを選択し、これを pKCB1 とした。（第4図）

II. 大腸菌での殺虫蛋白の生産

構築した発現プラスミド pKCB1 をCohen らの方法に従い、大腸菌 JM109株へ導入した。得られた大腸菌組換え体 JM109/pKCB1 が生産するバチラス・チューリゲンシス・アイザワイ IPL株の殺虫蛋白の同定・分析を以下の如く行った。大腸菌 JM109/pKCB1 株を最終濃度50 μ g/ml のアンピシリンを含む LBプロス液体培地中で一夜培養する。

0.3 ml の終夜培養液を分取し、遠心操作（10,000rpm, 2分間）により集菌し、100 μ l のサンプル緩衝液（62.5mM トリス・塩酸（pH8.8）、2%（w/v）ドデシル硫酸ナトリウム、5%（v/v）2-メルカプトエタノール、10%（v/v）グリセノール、0.01%（w/v）ブROMフェノールブルー）に懸濁後、100℃で5分間熱処理した。10,000rpmで5分間遠心し上清を分取した後、その20 μ l を Laemmli

らの方法（Nature 227, 680-685）に従って SDSポリアクリルアミド電気泳動にかけた。泳動後、ゲルをクマジーブリリアントブルーで染色し、脱気乾燥してろ紙に固定した。その結果、発現プラスミド pKCB1 を含む大腸菌 JM109株では、分子量130KDaと135KDaの2種の殺虫蛋白バンドが検出された。ゲル上の両蛋白バンドをデンスitomーターで測定したところ、大腸菌 JM109/pKCB1 株はそれぞれ全蛋白あたり5%の130KDaおよび3.5%の135KDa殺虫蛋白を同時生産していた。従って、大腸菌組換え体 JM109/pKCB1 は、バチラス・チューリゲンシス・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白である130KDaおよび135KDa殺虫蛋白を効率よく同時生産していることが明らかとなった。

III. 大腸菌で生産された殺虫蛋白の調製法

大腸菌組換え体 JM109/pKCB1 株を、LBプロス液体培地中で一夜培養した後、その0.1mlを10mlの LBプロス培地に移し、37℃で20時間培養した。培養液5mlを分取し、6,000rpm, 5分間遠心して菌を集め、-80℃で凍結させた後、室温で融解させ

た。この操作を3回くり返した後、2mlのTE緩衝液（10mM Tris・HCl（pH 7.5）/ 1mM EDTA）に懸濁し30秒づつ5回の超音波処理を行った。つぎに、この粗抽出液を7,000rpmで5分間遠心し沈澱を集めた。調製した沈澱成分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、含まれる全蛋白の少なくとも85%が殺虫蛋白であった。従って、上記調製法を用いることにより、容易に効率良く殺虫蛋白を調製できることが明らかとなった。なお、この調製法は、大量の培養液についても有効であることを確認している。1 l 培養液あたり約270mgの殺虫蛋白が生産された。130KDaと135KDa蛋白の量比はほぼ1:1であった。

IV. 大腸菌で生産された殺虫蛋白の殺虫活性

IIIに記載した方法で、大腸菌組換え体 JM109/pKCB1 株からBT殺虫蛋白を調製した。10gの鱗翅目幼虫用人工飼料を準備し、これに調製した殺虫蛋白懸濁液を加えた。処理した後、風乾し、ハスモンヨトウ（*Spodoptera litura*）あるいはカイコ（*Bombyx mori*）の4令幼虫をそれぞれ10匹放

飼した。放飼後、摂食3日間行わせた後、死亡した幼虫数を調査した。対照としては、大腸菌組換え体JH109/pTBI(特開昭62-181784)および大腸菌組換え体JH109/pKC6(ATCC 67487)からそれぞれ調製した130KDa殺虫蛋白および135KDa殺虫蛋白を用いた。カイコに対し各種殺虫蛋白10 μ gを人工飼料に処理した場合、135KDa殺虫蛋白および130KDa殺虫蛋白では、各々10匹中10匹および10匹中1匹の死亡が認められた。このとき、JH109/pKC81株由来の130KDa、135KDa混合殺虫蛋白では、10匹中6匹の死亡が認められた。一方、分類学上、カイコと異なるハスモンヨトウに対し、各種殺虫蛋白200 μ gを人工飼料に処理した場合、130KDa殺虫蛋白および135KDa殺虫蛋白では、各々10匹中10匹および10匹中1匹の死亡が認められた。このとき、JH109/pKC81株由来の130KDa、135KDa混合殺虫蛋白では、10匹中7匹の死亡が認められた。従って、本発明の大腸菌組換え体JH109/pKC81株のつくる殺虫蛋白は、上記の両昆虫に対し有効な殺虫蛋白であることが判明した。

dTTP) 中37℃で60分間反応した。反応後、常法に従い、クロロホルム・フェノール処理、エタノール沈澱を行いDNAを回収し、10 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した。得られたDNA溶液5 μ lに、pSaeIリンカー(宝酒造)1 μ lを加え、DNAライゲーションキット(宝酒造)A液40 μ l及び同B液5 μ lを加えて攪拌し、16℃、1時間反応した。その後、Cohenらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110-2114)に従い、反応液を大腸菌JH 109株(ファルマシア社)に形質転換した。出現したアンピシリン耐性のコロニーをLBプロス培地にて培養し、Birnboimらの方法(Nucleic Acids Res.) 7, 1513-1523)に従い、プラスミドDNAを調製した。約1 μ gのプラスミドDNAに、3ユニットの制限酵素SaeIを加え、20 μ lのHigh反応液(前述)中で37℃、1時間反応し、アガロースゲル電気泳動で分析した。約1.6Kbおよび6.6Kbの2本のSaeI断片を持つプラスミドを選択し、これをpTBI-12とした。さらにpTBI-12のSaeI切断混液5 μ lにDN

実施例2

1. 2種の殺虫蛋白の同時発現用プラスミドpTBKCSの構築

ステップ1: プラスミドpTBISの構築

約5 μ gの130KDaの殺虫蛋白遺伝子発現用プラスミドpTBI(特開昭62-181784に従い、パチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL No.7株(PERM BP-1150)より構築できる)に20ユニットの制限酵素NdeIを加え、200 μ lのHigh反応液(50mMトリス、塩酸(pH 7.5)、100mM NaCl、10mM MgCl₂、1mMジチオスレイトール)中で37℃1時間反応後、反応液に等量のクロロホルム・フェノール(1:1)混液を加え、混合し、10,000rpmで5分間遠心した。実施例1の1-ステップ1に従いDNAを回収し、10 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した。得られたDNA溶液5 μ lに10ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼ・クレノー断片を加え、20 μ lのポリメラーゼ反応液(50mMリン酸カルシウム、5mM MgCl₂、1mM 2-メルカプトエタノール、50 μ M dATP、50 μ M dGTP、50 μ M

AライゲーションキットA液40 μ l、B液 μ lを加え、37℃で1時間反応し、大腸菌JH 109株に形質転換した。得られたコロニーから前述のようにプラスミドDNAを調製し、6.6KbのSaeI断片のみを生じるクローンを選択し、そのプラスミドをpTBISとした。

ステップ2: 135KDa蛋白遺伝子を含む5Kb SaeI Iカートリッジの作製

約5 μ gの135KDaの殺虫蛋白遺伝子発現用プラスミドpKC6(ATCC 67487)に10ユニットの制限酵素NruI(バイオ・ラボ社)を加え、200 μ lのNruI反応液(50mMトリト・塩酸(pH 7.5)、50mM NaCl、50mM KCl、10mM MgCl₂)中で37℃1時間反応後、常法に従い臭化エチジウムを含む0.8%のアガロース電気泳動により、DNAが1ヶ所切断が行われていることを確認した。引きつづき、フェノール処理及びエタノール沈澱を行ない、DNAを回収し10 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した。このようにして調製したDNA溶液5 μ lに5 μ lの制限酵素ScaIを加え、100 μ l

の Sca I 反応液 (10mM Tris-HCl (pH 8.0)、20mM KCl、7mM MgCl₂、7mM 2-MeOH) 中で37℃ 1時間反応後、常法に従いフェノール抽出、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。

一方、5μgのクローニングベクターpUC18 (ファルマシア社) に対し、5ユニットの制限酵素 Sma I (宝酒造) を加え、Sma I 反応液 (10mM トリス・塩酸 (pH 7.5)、20mM KCl、7mM MgCl₂、7mM 2-MeOH) 中で30℃、1時間反応し、常法に従いDNAを回収し、10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。10μlのDNA溶液に5ユニットのアルカリホスファターゼ (宝酒造) を加え、ホスファターゼ反応液 (10mM トリス・塩酸 (pH 8.0)、100mM KCl、1M MgSO₄) 中で65℃ 1時間反応後、常法のフェノール・クロロホルム処理を2回行った後、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。このようにして調製した約1μgの Sca I 切断済みのプラスミド pUC18と先に調製した約1μgの5.0Kb

の Sma I-Nru I DNA断片を混合し、全容10μlとし、DNAライゲーションキット (宝酒造) A液40μl及びB液5μlを加えて攪拌し、16℃で1時間反応した。その後、反応液5μlを大腸菌JM 109株コンピテントセル (宝酒造) 100μlと混合し、形質転換を行った。形質転換体を最終濃度2mMのイソプロピル-β-D-ガラクトシド (IPTG) 0.05mM-gal、および50μg/mlのアンピシリンを含むレブロス平板培地 (1lの蒸留水に対し、10gのトリプトン (ディフコ社)、5gのNaCl (半井化学)、5gのイーストエキストラクト (ディフコ社) を加え、さらに12gの寒天を加え固化した培地) にプレートした。出現したアンピシリン耐性の白色コロニーを培養し、プラスミドDNAを調製した。約1μgのプラスミドDNAに3ユニットの制限酵素 Sa I を加え、20μlのHigh反応液中で37℃、1時間反応し、アガロース電気泳動で分析した。インサートDNAとして5.0Kbの Sa I 断片をもつプラスミドを選択し、これを pKU58とした。10μ

gのプラスミド pKU58に対し10ユニットの制限酵素 Sa I を加えて、37℃ 1時間反応後、反応液を臭化エチジウムを含む0.8%の低融点アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。常法に従い、紫外線ランプ下で5.0KbのDNA断片に相当するバンドを切り出し、ゲルを融解した。さらにフェノール処理を行い、DNAをエタノール沈澱により回収し、10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。

ステップ3：発現プラスミドpTBK5の構築

約5μgのプラスミド pTB1Sに10ユニットの制限酵素 Sa I を加え、100μlのHigh反応液中で、37℃ 1時間反応後、常法に従い、クロロホルム・フェノール処理およびエタノール沈澱を行いDNAを回収10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。得られた10μlのDNA溶液に5ユニットのアルカリホスファターゼ (宝酒造) を加え、ホスファターゼ反応液 (前述) 中で37℃ 1時間反応後、常法のフェノール・クロロホルム処理を2回行った後、エタノール沈澱し、DNAを回収し、10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。このようにして調製した Sa I

Sa I 切断済みDNAの5μlに対し、ステップ2で調製した5Kb Sa I カートリッジ5μlを加え、常法に従いリガーゼ反応を行った。この反応液を大腸菌JM 109株に形質転換し、アンピシリン耐性コロニーを選択した。常法に従いプラスミドDNAを調製後、制限酵素 Sa I 切断を行い、6.6Kbおよび5.0Kbの断片を生じるコロニーを選択し、さらに制限酵素 Bam H I の切断により6.6Kb、5.0Kbの断片を生じるクローンpTBK5を得た。このプラスミドは、tacプロモーターとrrnBターミネーターを含む130KDa蛋白遺伝子カートリッジとtacプロモーターとrrnBターミネーターを含む、135KDa蛋白遺伝子カートリッジが正方向に並んでいるクローンであることが確認された。

II. 大腸菌での殺虫蛋白の生産

得られた大腸菌組換え体JM 109/pTBK5が生産するバチラス・チューリンゲンシス・アイザワイI PL株の殺虫蛋白の同定・分析を実施例IのIIに従い行った。その結果、発現プラスミドpTBK5を含む大腸菌JM 109株では、分子量130KDaと135KDa

の2種の殺虫蛋白バンドが検出された。ゲル上の両蛋白バンドをデンストメーターで測定したところ、大腸菌JM 109/pTBKC5株はそれぞれ全菌体蛋白あたり12%の130kDaおよび12%の135kDa殺虫蛋白を同時生産していた。従って、大腸菌組換え体JM 109/pTBKC5は、パチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の2種の殺虫蛋白である130kDaおよび135kDa殺虫蛋白を効率よく同時生産していることが明らかとなった。

Ⅲ. 大腸菌で生産された殺虫蛋白の調製法

大腸菌組換え体JM 109/pTBKC5株から実施例1のⅢに従い殺虫蛋白を調製した。調製した沈澱成分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、含まれる全蛋白の少なくとも90%が殺虫蛋白であった。1ℓの培養液あたり約380mgの殺虫蛋白が生産された。130kDaと135kDaの蛋白の量比は1:1であった。

Ⅳ. 大腸菌で生産された殺虫蛋白の殺虫活性

Ⅲに記載した方法で、大腸菌組換え体JM 109/pTBKC5株からBT殺虫蛋白を調製した。10gの鱗翅

目幼虫用人工飼料を準備し、これにⅢで調製した殺虫蛋白懸濁液を以下の割合で加えた。処理した後、風乾し、ハスモンヨトウ (*Spodopteralitura*) あるいはカイコ (*Bombyx mori*) の4令幼虫をそれぞれ6匹放飼した。放飼後、ハスモンヨトウについては6日間、カイコについては3日間摂食させた後、死亡した幼虫数を調査した。対照としては、大腸菌組換え体JM 109/pBT (特開昭62-181784) および大腸菌組換え体JM 109/pKC6 (ATCC 67487) からそれぞれ調製した130kDa殺虫蛋白および135kDa殺虫蛋白を用いた。カイコに対し各種殺虫蛋白50μgを人工飼料に処理した場合、135kDa殺虫蛋白および130kDa殺虫蛋白では、各々10匹中8匹および10匹中2匹の死亡が認められた。このとき、JM 109/pTBKC5株由来の130kDa、135kDa混合殺虫蛋白では、10匹中4匹の死亡が認められた。一方、分類学上、カイコと異なるハスモンヨトウに対し、各種殺虫蛋白540μgを人工飼料に処理した場合、130kDa殺虫蛋白および135kDa殺虫蛋白では、各々6匹中2匹

および6匹中0匹の死亡が認められた。なお、前者ではさらに成育不良個体が2匹認められた。このとき、JM 109/pTBKC5株由来の130kDa、135kDa混合蛋白では、6匹中2匹の死亡が認められた。このときの飼料植物の被害の程度は、130kDa殺虫蛋白、130kDaおよび135kDa混合殺虫蛋白、135kDa殺虫蛋白の順に大きかった。従って、本発明の大腸菌組換え体JM 109/pTBKC5株のつくる殺虫蛋白は、上記の両昆虫に対し十分に有効な殺虫蛋白であることが判明した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、パチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株のプラスミドDNAからクローン化した130kDa殺虫蛋白構造遺伝子の塩基配列および塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示している。

第2図は、パチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ I PL株の染色体DNAからクローン化した135kDa殺虫蛋白構造遺伝子の塩基配列および塩基配列から推定されたアミノ酸配列を示している。

第3図は、プラスミドpKC81の130kDa殺虫蛋白

遺伝子および135kDa殺虫蛋白遺伝子の接続部位を示している。塩基配列およびボックスの下は各遺伝子の由来領域を示している。塩基配列およびボックスの上の矢印は制限酵素部位を、-35および-10は各々135kDa殺虫蛋白遺伝子の大腸菌プロモーター・コンセンサス-35領域、-10領域を、SDはShine-Dalgarno配列を示している。

Ba: Bam HI, Pa: Pst I,

Ba/Ba: Bam HIとBam HIの結合部位

Hc/Ab: Hinc IIとAha III部位の結合部位

EV223-4; 発現ベクター-pKK223-4

V18L; ベクター-pUC18のリンカー部分

130kDa(5'): 130kDa殺虫蛋白遺伝子の5'末端部分

130kDa: 130kDa殺虫蛋白構造遺伝子

130kDa(3'): 130kDa殺虫蛋白遺伝子の3'末端部分

10塩基

130kDa(3')と135kDa(5')の間に位置するV18L;

ベクター-pUC18のリンカー部分24塩基

とそれに続く210塩基

135kDa(5'): 135kDa殺虫蛋白遺伝子の5'末端部分

135KDa:135KDa 殺虫蛋白構造遺伝子

135KDa(3'):135KDa 殺虫蛋白遺伝子の3'末端部分

tac ; tacプロモーター,

rrnB terminator:リボソーム RNA遺伝子のターミ

ネーター

黒色部分、白色部分はそれぞれ殺虫蛋白構造遺伝子およびその3'末端、5'末端部分を示す。

第4図は、130KDaの殺虫蛋白遺伝子をBamHIカトリッジとして保有するプラスミド pAH11の構築および130KDa,135KDa の殺虫蛋白遺伝子を同時発現するためのプラスミドpKCB1の構築を示している。

pol I : DNA ポリメラーゼ I, Nd : Nde I, Bm : Bam HI, Kp : Kpn I, Pv : Pvu II, Pa : Pst I,
tac : tacプロモーター, rrnB (T) : リボソーム RNA遺伝子のターミネーターを各々示す。

白色部分、黒色部、およびドット部分はそれぞれ tacプロモーター、殺虫蛋白遺伝子部分およびリボソーム RNA遺伝子ターミネーターを示している。

第5図は、大腸菌JM109/pKCB1株で同時生産され

た130KDaおよび135KDa殺虫蛋白の SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンとのデンスitomーターキャンを示している。

第6図は、130KDa、135KDaの殺虫蛋白遺伝子を同時に発現するためのプラスミドpTBKC5の構築を示している。

pol I : DNAポリメラーゼ I、

Bm : Bam HI、Kp : Kpn I、

Nd : Nde I、Nr : Nru I、

Sa : Sai I、Sc : Sca I、

Sm : Sma I、

Nr / Sm : Nru IとSma Iの結合部位

Sc / Sm : Sca IとSma Iの結合部位

白色部分、黒色部分、およびドット部分は各々、tacプロモーター、殺虫蛋白遺伝子、およびリボソーム RNA遺伝子ターミネーターを示している。

第7図は、大腸菌JM 109/pTBKC5株で同時生産された130KDaおよび135KDa殺虫蛋白の SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンとのデンスitomーターキャンを示している。

TGTTAACCCCTGGGTCAAAAATTGATATTTAGTAA

AATTACTTGCACTTTGTGCATTTTTCATAAGATGAGTCATATGTTTTAAATTGTAGTAATGAAAACAGTATTATATCATATGAATTGGTATCTTAATAAAAAGAGATGGAGGTAACCTT

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCTTATAAATTGTTAAAGTAACCCCTGAAGTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCCCTTG

MetAspAsnAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeuGlyGluArgIleGluThrGlyTyrThrProIleAspIleSerLeu

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGTGCTGGATTGTTGTAGGACTAGTTGATATATATGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGATTTCTTGTACAAAT

SerLeuThrGlnPheLeuLeuSerGluPheValProGlyValAlaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGlnTrpAspAlaPheLeuValGlnIle

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

GAACAGTTAATTAACCAAGATAGAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTAGAGGACTAAGCAATCTTTATCAAAATTTACGCAGAAATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT

GluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAlaIleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480

CCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATCGGTATTCAATTCAATGACATGAACAGTGCCTTTACAACCGCTATTCCCTCTTTTGCAGTTCAAAAATTTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA

ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAlaIleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerVal

490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

TATGTTCAAGCTGCAAAATTTACATTTTATCAGTTTGTAGAGATGTTTCAGTGTGTTGGACAAGGTGGGATTTGATGCGCGGACTATCAATAGTCGTTATTAATGATTTAAGCTTAT

TyrValGlnAlaAlaAsnLeuHisLeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArgTyrAsnAspLeuThrArgLeuIle

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

GGCACTATACAGATCATGCTGTACGTTGATACGAGTATGAGCGGTGTATGGGACCGGATTTCTAGAGATTGGTAAGATATAATCAAAATTTAGAAGAGAATTAACACTAAGCTA

GlyAsnTyrThrAspHisAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGluArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpIleArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal

730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840

TTAGATATCGTTTCTCTATTTCCGAACATGATAGTAGAAGTATCCCAATTCGAACAGTTTCCCAATTAACAAGAGAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGTATGGTAGTTT

LeuAspIleValSerLeuPheProAsnTyrAspSerArgThrTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThrArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPhe

850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960

CGTCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAGTATTAGGAGTCCACATTTGATGGATATACAGTATACCATCTATACGGGATCTCATAGAGGAGAATATTATTGGTCAGGCGCATCAA

ArgAlaLeuAlaGlnGlyIleGluGlySerIleArgSerProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspAlaHisArgGlyGluTyrTyrTrpSerGlyHisGln

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080

ATAATGCTTCTCCTGTAGGTTTTCGGGGCCAGAAATTCACATTTTCGCTATATGGAACATATGGAAATGCAGCTCCACAACACGATTTGTTGCTCAACTAGGTCAAGCGGTGTATAGA

IleMetAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheThrPheProLeuTyrGlyThrMetGlyAsnAlaAlaProGlnGlnArgIleValAlaGlnLeuGlyGlnGlyValTyrArg

1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200

ACATTATCGTCCACTTTATATAGAAGACCTTTTAATATAGGATATAATCAACAACATCTGTCTTGGAGGACAGAAATTTGCTTATGGAACTCTCAAAATTTGGCATCCGCTGTA

ThrLeuSerSerThrLeuTyrArgArgProPheAsnIleGlyIleAsnAsnGlnGlnLeuSerValLeuAspGlyThrGluPheAlaTyrGlyThrSerSerAsnLeuProSerAlaVal

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320

TACAGAAAAGCGGAACGGTAGATTTCGTTGGATGAATACCCACAGAAATACCAACGTCCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAGCCATGTTTCAATGTTTTCAGGCTTT

TyrArgLysSerGlyThrValAspSerLeuAspGluIleProProGlnAsnAsnValProProArgGlnGlyPheSerHisArgLeuSerHisValSerMetPheArgSerGlyPhe

1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
AGTAAATAGTAGTAAATGAAGAGCTCCTATGTTCTCTTGATACATCGTAGCTGCTGAATTAATAATAATAATTCCTTCATCACAAATACACAAATACCTTTAACAAATCTACTSerAsnSerSerValSerLelleArgAlaProMetIleArgAlaProMetIleHisArgSerAlaGluPheAsnAsnLelleProSerSerGlnIleThrGlnIleProLeuThrLysSerThr											
1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
AAATCTTGCGTCTGGAACCTCTGCTTAAGGACACGAGATTTACAGGAGAGATATTTCTCGAAGAACTTCACCTGGCCAGATTTCAACCTTAAGAGTAAATATTACTGCACCATTATCAAsnLeuGlySerGlyThrSerValValLysGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSerProGlyGlnIleSerThrLeuArgValAsnIleThrAlaProLeuSer											
1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
CAAAGATATCCGGGTAAAGATTCGCTACGCTTCAACCAAAATTTACAATTCATCAATTCACGGAAGACCTATTAAATCAGGGGAATTTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTAAATGlnArgTyrArgValArgIleArgTyrAlaSerThrThrAsnLeuGlnPheHisThrSerIleAspGlyArgProIleAsnGlnGlyAsnPheSerAlaThrMetSerSerGlySerAsn											
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
TTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAATGGATCAAGTGATTTTACGTTAAGTGCTCATGCTCTTCAATTCAGCAATCAAGTTTATATATAGATLeuGlnSerGlySerPheArgThrValGlyPheThrProPheAsnPheSerAsnGlySerValPheThrLeuSerAlaHisValPheAsnSerGlyAsnGluValTyrIleAsp											
1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
CGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAACTAACCTTTGAGCGAGAATATGATTTAGAAAGACACAAAAGGGGTGAATGAGCTGTTTACTTCTTCCAATCAAAATCGGGTTAAAAACAGATGTGArgIleGluPheValProAlaGluValThrPheGluAlaGluTyrAspLeuGluArgAlaGlnLysAlaValAsnGluLeuPheThrSerSerAsnGlnIleGlyLeuLysThrAspVal											
1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040
ACGGATTATCATATTGATCAAGTATCCAATTTAGTTGAGTGTTTATCTGATGAATTTTGTCTGGATGAAAAAAAAGAATTTGTCGGAAGAAAGTCAAAACATCGGAAGCGACTTACTGATGAGThrAspTyrHisIleAspGlnValSerAsnLeuValGluCysLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysLysGluLeuSerGluLysHisAlaLysArgLeuSerAspGlu											
2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160
CGGAATTTACTTCAAGATCCAAACTTTAGAGGGATCAATAGACAACTAGACCGTGGCTGGAGAGGAAGTACGGATATTACCATCCAAGGAGGGATGACGTATTCGAAAGAGAATTACGTTArgAsnLeuLeuGlnAspProAsnPheArgGlyIleAsnArgGlnLeuAspArgGlyTyrPArgGlySerThrAspIleThrIleGlnGlyAspAspValPheLysGluAsnTyrVal											
2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280
ACGCTATTGGGTACCTTGATGAGTGCTATCCAACGTATTTATATCAAAAATAGATGAGTCGAAATTAAGAGCTATACCCGTTACCAATTAAGAGGGGTATATCAAGATAGTCAAGACThrLeuLeuGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLysAlaTyrThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAsp											
2290	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
TTAGAAATCTATTAAATTCGCTACAATGCCAAACACGAAACAGTAAATGTCCAGGTACGGTTTCCTTATGGCGCTTTTCAGCCCCAAGTCCAATCGGAAATGTGCCCATCTCCCATLeuGluIleTyrLeuIleArgTyrAsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTyrProLeuSerAlaProSerProIleGlyLysCysAlaHisSerHis											
2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520
CATTTCTCTTGACATTGATGTTGGATGTACAGACTTAAATAGGACTTAAAGTGTATGGTGATATTCAAGATTAAAGACCGAAGTGGCCATGCAAGACTAGGAATCTAGAAATTTCTCTHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsnGluAspLeuGlyValTyrPValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuGluPheLeu											
2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640
GAAGAGAAACCATTAGTAGGAGAACCATAGCTCGTGAAAAGACCCGAGAAAAATGGAGAGACAAACGTGAAAAATTTGGAATGGAAAAACAATATTTGTTTATAAAGAGCGCAAAAGAAAGluGluLysProLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArgAlaLysLysTyrPArgAspLysArgGluLysLeuGluTyrPValThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGlu											
2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760
TCTGTAGATGCTTTATTTGTAACCTCTCAATATGATAGATTACAAGCGGATACCAACATCGCGATGATTCATCGCGCAGATAAACCGCTTCATACCATTCGAGAACCTTATTCGCTGAGSerValAspAlaLeuPheValAsnSerGlnTyrAspArgLeuGlnAlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgValHisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGlu											

第1図 (その3)

2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 CTGCTGTGATCCGGGTCAATGGCGCTATTTTGAAGAATTAGAAGGGCGTATTTTCACTGCATTCCTCCTATATGATCGAGAAATGCTATTAATAATATGCGC
 LeuSerValIleProGlyValAsnAlaAlaIlePheGluGluLeuGluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsnAsnGly

 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 TTATCCTGCTGGAACGTGAAGGCGATGTAGATGTAGAAACAACAACCAACGTTCCGGTCCTTGTTCGGAAATGGGAAGCAGAACTGTCAAGAAGTTCGTGTCTGTCGGGT
 LeuSerCysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGlnAsnAsnGlnArgSerValLeuValValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGly

 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 CGTGGCTATATCCTTCGTGCACAGCGTACAGGAGGGATATGGAGAAGGTTCCGTAAACCATTCATGAGATCGAGAACAAATACAGACGAAGTGAAGTTTAGCAACTTTGTAGAAGAGGAA
 ArgGlyTyrIleLeuArgValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGlyGluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGluLeuLysPheSerAsnPheValGluGluGlu

 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 GTATATCCAAACACACGCTAACGTGTAATGATTATCTCGGACTCAAGAAGAAATATGAGGGTACGTACACTTCTCGTAATCGAGGATATGACGGAGCCTATGAAAGCAATTCTTCTGTA
 ValTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrAlaThrGlnGluGluTyrGluGlyThrTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAspGlyAlaTyrGluSerAsnSerSerVal

 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 CCAGCTGATTATGCATCAGCCTATGAAGAAAGCATATACAGATGGACGAGAGACAATCCTTGTGAATCTAACAGAGGATATGGGGATTACACACCACTACCAAGCTGGCTATGTGACA
 ProAlaAspTyrAlaSerAlaTyrGluGluLysAlaTyrThrAspGlyArgArgAspAsnProCysGluSerAsnArgGlyTyrGlyAspTyrThrProLeuProAlaGlyTyrValThr

 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470
 AAAGAATTAGAGTACTCCAGAAACCGATAGGTATGGATTGAGATCGGAGAAACGGAGGAACATTTCATCGTGGACAGCGTGAATTTCTTATGGAGGAATAATATATGCTTTAA
 LysGluLeuGluTyrPheProGluThrAspLysValTrpIleGluIleGlyGluThrGluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuLeuNetGluGlu***

第2図 (その1)

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 ATGGATAACCAATCCGAACATCAATGAATGCATTCTTATAATTTGTTAAAGTAACCCCTCAAGTAGAAGTATTAGGTGGAGAGAAAGTAAGAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCTTGT
 MetAspAsnProAsnIleAsnGluCysIleProTyrAsnCysLeuSerAsnProGluValGluValLeuGlyGlyGluArgIleGluThrGlyTyrProIleAspIleSerLeu
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 TCGTAACGCAATTTCTTTGAGTGAATTTGTTCCCGTCTGGATTGTGTAGGACTAGTTGATATAATATGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTCTTGTACAAATT
 SerLeuThrGlnPheLeuLeuSerGluPheValProGlyValaGlyPheValLeuGlyLeuValAspIleIleTrpGlyIlePheGlyProSerGlnTrpAspAlaPheLeuValGlnIle
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 GAACAGTTAAATTAACCAAGAAATAGAGAAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTAGAGGACTAAGCAATCTTTATCAAAATTTACGCAGATCTTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT
 GluGlnLeuIleAsnGlnArgIleGluGluPheAlaArgAsnGlnAlaIleSerArgLeuGluGlyLeuSerAsnLeuTyrGlnIleTyrAlaGluSerPheArgGluTrpGluAlaAsp
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 CCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTCACATGACATGAACAGTGCCTTACAAACCGCTATTCTCTCTTTTGCAGTTCAAAATTTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA
 ProThrAsnProAlaLeuArgGluGluMetArgIleGlnPheAsnAspMetAsnSerAlaLeuThrThrAlaIleProLeuPheAlaValGlnAsnTyrGlnValProLeuLeuSerVal
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TATGTTCAAGCTGCAAAATTTACATTATCAGTTTGTAGAGATGTTTCAGTGTTTGACAAAGGTGGGATTGTATGCGCGACTATCAATAGTCGTTATATGATTAACTAGGCTTATT
 TyrValGlnAlaAlaAsnLeuHisLeuSerValLeuArgAspValSerValPheGlyGlnArgTrpGlyPheAspAlaAlaThrIleAsnSerArgTyrAsnAspLeuThrArgLeuIle
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 GGCAACTATACAGATTATGTCGCTGTGACAAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGACCGGATTCTAGAGATTGGTAAAGGTATATCAATTTAGAGAGAGACTAACACTTACTGTA
 GlyAsnTyrThrAspTyrAlaValArgTrpTyrAsnThrGlyLeuGluArgValTrpGlyProAspSerArgAspTrpValArgTyrAsnGlnPheArgArgGluLeuThrLeuThrVal
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840
 TTAGATATCGTTGCTCTATTCTCAAATTATGATAGTCGAAGGTATCCAATTCGAACAGTTTCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACGAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTACTGTTT
 LeuAspIleValAlaLeuPheSerAsnTyrAspSerArgArgTyrProIleArgThrValSerGlnLeuThrArgGluIleTyrThrAsnProValLeuGluAsnPheAspGlySerPhe
 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
 CGTGAATGGCTCAGAGATAGAACAGAAATATTAGGCAACACATCTTATGGATATCCTTAATAGTATACCATTTTACTGATGTGCATAGAGGCTTTAAATTATTGGTCAGGGGCATCAA
 ArgGlyMetAlaGlnArgIleGluGlnAsnIleArgGlnProHisLeuMetAspIleLeuAsnSerIleThrIleTyrThrAspValHisArgGlyPheAsnTyrTrpSerGlyHisGln
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ATAACAGCTTCTCCTGTAGGGTTTTCAGGACCAAGAAATTCGCTTTTATTTGGGAATGCGGGAATGCAAGCTCAGCTCCACCCGACTTGTCTCATTAACTGGTTTGGGATTTTGAACA
 IleThrAlaSerProValGlyPheSerGlyProGluPheAlaPheProLeuPheGlyAsnAlaAlaProValLeuValSerLeuThrGlyLeuGlyIlePheArgThr
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TTATCTTCACCTTTATAGAGAATTATACCTTGGTTTCAGGCCCAATAATCAGGAATGTTTGTCTTGTGGAACGGAGTTTCTTTTGCCTCCCTAACGACCAACTTGCCTTCCACT
 LeuSerSerProLeuTyrArgArgIleIleLeuGlySerGlyProAsnAsnGlnGluLeuPheValLeuAspGlyThrGluPheSerPheAlaSerLeuThrThrAsnLeuProSerThr

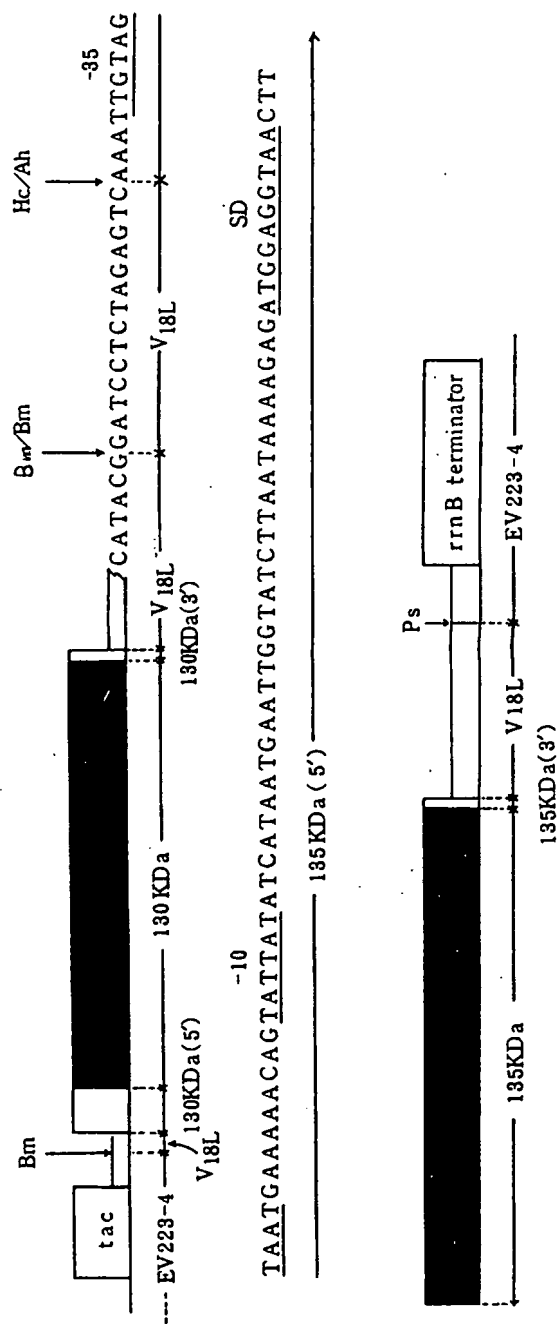
第2図 (その2)

1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
ATATATAGACAAAGGGGTACAGTCGATTCACTAGATGTAATACCGCCACAGGATAAATAGTGACACCTCGTGGGGATTAGCCATCGATTGAGTCATGTTACAAATGCTGAGCCAAGCA											
1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440
GCTGGCAGCAGTTTACACCTTGAGAGCTCCAAACGTTTCTTGGCAGCATCGCAGTGCCTGAATTAATAATAATTCCTTCATCACAAATACACAAATACCTTTAACAAAATCTACTAAT											
1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
AlaGlyAlaValTyrThrLeuArgAlaProThrPheSerTrpGlnHisArgSerAlaGluPheAsnAsnIlelleProSerSerGlnIleThrGlnIleProLeuThrLysSerThrAsn											
1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
CTTGCTCTGGAACTTCTGTCGTTAAAGGACGAGGATTACAGGAGGAGATATCTTCGAAGAAGCTTCACCTGGCCAGATTTCACAGGTAATTAAGAGTAATATTACTGCACCATTTATCACA											
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
LeuGlySerGlyThrSerValValLysGlyProGlyPheThrGlyGlyAspIleLeuArgArgThrSerProGlyGlnIleSerThrLeuArgValAsnIleThrAlaProLeuSerGln											
1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
AGATATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACTACAAATTTACAAATTCACATCAATTCACGGAAGACCTATTATACAGGGTAATTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTAATTTA											
1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040
ArgTyrArgValArgIleArgTyrAlaSerThrThrAsnLeuGlnPheHisThrSerIleAspGlyArgProIleAsnGlnGlyAsnPheSerAlaThrMetSerSerGlySerAsnLeu											
2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160
CAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGTGTTCCTTACTCCCTTTAACTTTTCAATGGATCAAGTGTATTACGTTAAGTGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAGATCGA											
2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280
GlnSerGlySerPheArgThrValGlyPheThrThrProPheAsnPheSerAsnGlySerValPheThrLeuSerAlaHisValPheAsnSerGlyAsnGluValTyrIleAspArg											
2290	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
ATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTGAGGCAGATATGATTTAGAAAGAGCACAAGGGGTGAATGAGTGTCTTACTTCTTCCAATCAAAATCGGGTTAAAAACAGATGTGACG											
2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520
IleGluPheValProAlaGluValThrPheGluAlaGluTyrAspLeuGluArgAlaGlnLysAlaValAsnGluLeuPheThrSerSerAsnGlnIleGlyLeuLysThrAspValThr											
2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640
1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040
GATTATCATATTGATCAAGTATCCAATTTAGTTGAGTGTTCATCATGATGAATTTTGTCTGGATGAAAAACAAGAAATTCGAGAAAGTCAAAACATCGGAGCGACTTACTGATGACCGG											
2590	2600	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
AspTyrHisIleAspGlnValSerAsnLeuValGluCysLeuSerAspGluPheCysLeuAspGluLysGlnLysGlnLysValLysHisAlaLysArgLeuSerAspGluArg											
2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820
AATTTACTTCAAGATCCAACCTTCAGAGGGTCAATAGACAACACTAGCCGCTGGAGGAGGAGTACGGATATTACCATCCAGGAGGCGATGAGCTATTCAAAGAGAAATTACGTTACG											
2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900	2910	2920	2930	2940
AsnLeuLeuGlnAspProAsnPheArgGlyIleAsnArgGlnLeuAspArgGlyTrpArgGlySerThrAspIleThrIleGlnGlyGlyAspValPheLysGluAsnTyrValThr											
2950	2960	2970	2980	2990	3000	3010	3020	3030	3040	3050	3060
CTATTGGGTACCTTTGATGATGCTATCCAACGCTATTATATCAAAAATAGATGAGTCGAAATTAAGAGCTATACCCGTTATCAATTAAGAGGATATATCGAAGATAGTCAAGACTTA											
3070	3080	3090	3100	3110	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180
LeuLeuGlyThrPheAspGluCysTyrProThrTyrLeuTyrGlnLysIleAspGluSerLysLeuLysAlaTyrThrArgTyrGlnLeuArgGlyTyrIleGluAspSerGlnAspLeu											
3190	3200	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300
GAAATCTATTAAATTCGCTACAATGCAAAACATGAAACAGTAAATGTGCCAGGTACGGGTTCCCTTATGGCGCTTTTCAGCCCAAGTCCCAATCGGAAAGTGTGGAGAGCGCAATCCGATCG											
3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380	3390	3400	3410	3420
GluIleTyrLeuIleArgTyrAsnAlaLysHisGluThrValAsnValProGlyThrGlySerLeuTrpProLeuSerAlaGlnSerProIleGlyLysCysGlyGluProAsnArgCys											

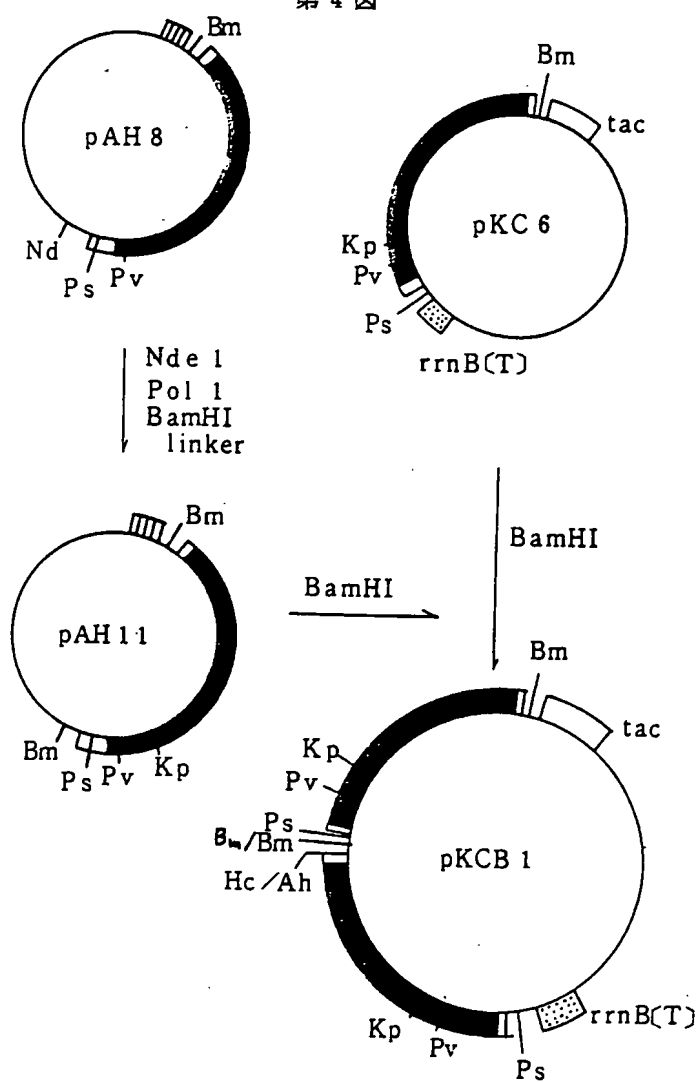
第2図 (その3)

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 GCGCACACCTTGAATGGAATCCTGACTTAGATTGTTCTGTAGGATGGAGAAAGTGTGCCATCATTCCTCTAGCATTTCTAGCATTTAGTGTAGGATGTACAGACTTAAATGAG
 AlaProHisLeuGluTrpAsnProAspLeuAspCysSerCysArgAspGlyGluLysCysAlaHisHisSerHisPheSerLeuAspIleAspValGlyCysThrAspLeuAsnGlu
 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 GACCTAGGTGTATGGGTGATCTTTAAGATTAAAGACGCAAGATGGCAGACTAGGAAATCTAGAGTTTCTCGAAGAGAAACCATTAGTAGGAGAACCGCTAGCTCGTGTGAAAGA
 AspLeuGlyValTrpValIlePheLysIleLysThrGlnAspGlyHisAlaArgLeuGlyAsnLeuPheLeuValGlyGluAlaLeuAlaArgValLysArg
 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 GCGGAGAAAAATGGAGACACAAACCTGAAATTTGGAATGGGAAACAAATATCGTTTATAAGAGGCAAAAGAAATCTGTAGATGCTTTTATTTGTAACCTCTCAATATGATCAATTACAA
 AlaGluLysLysTrpArgAspLysArgGluLysLeuGluTrpGluThrAsnIleValTyrLysGluAlaLysGluSerValAspAlaLeuPheValAsnSerGlnTyrAspGlnLeuGln
 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 CCGGATACGAATATTGCCATGATTTCGCGCAGATAAACGTGTTTCATAGCATTCGAGAAGCTTATCTGCCTGAGCTGTCTGTGATTCGGGTGTCAATCGGCTATTTTGAAGAATTA
 AlaAspThrAsnIleAlaMetIleHisAlaAlaAspLysArgValHisSerIleArgGluAlaTyrLeuProGluLeuSerValIleProGlyValAsnAlaIlePheGluGluLeu
 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 GAAGGCGTATTTTCACTGCATTCTCCTATATGATCGGAGAAATGCTCATTAAAAATGCTGATTTAATAATGGCTTATCCTGTGGAACCTGAAAGGCGCATGTAGATGTAGAAGAACAA
 GluGlyArgIlePheThrAlaPheSerLeuTyrAspAlaArgAsnValIleLysAsnGlyAspPheAsnAsnGlyLeuSerCysTrpAsnValLysGlyHisValAspValGluGluGln
 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 AACAAACCAACGTTCCGTCCTGTTGTTCCGGAATGGGAACGACAGAGTGTACAAAGAGTTCGTCTGTCCGGTGTGGCTATATCCTTCTGTGTACAGCGTACAGGAGGATATGGA
 AsnAsnGlnArgSerValLeuValProGluTrpGluAlaGluValSerGlnGluValArgValCysProGlyArgGlyTyrIleLeuArgValThrAlaTyrLysGluGlyTyrGly
 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 GAAGTTGCGTAACCATTCATGAGATCGAGAACAAATACAGACGCACTGAAGTTTAGCAACTGCGTAGAAGAGGAATCTATCCAAATAACACGGTAACGTGTAATGATTATCTGTAAT
 GluGlyCysValThrIleHisGluIleGluAsnAsnThrAspGluLeuLysPheSerAsnCysValGluGluGluIleTyrProAsnAsnThrValThrCysAsnAspTyrThrValAsn
 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 CAAGAAGAAATACGGAGGTGCGTACACTTCTGTAATCGAGGATATAACGAGACCTCCTCCGTACCACTGATTATCGGTCACTCTATGAAGAAAAATCGTATACAGATCGACGACGAGAG
 GlnGluGluTyrGlyAlaTyrThrSerArgAsnArgGlyTyrAsnGluAlaProSerValProAlaAspTyrAlaSerValTyrGluLysSerTyrThrAspGlyArgArgGlu
 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 AATCCTTGTGAATTAACAGAGGGTATAGGGATTACACGCCACTACCGTGTGTTATGTGACAAAGAAATAGAAATCTCCAGAAACCGATAGGTATGGATTGGAGAAACG
 AsnProCysGluPheAsnArgGlyTyrArgAspTyrThrProLeuProValGlyTyrValThrLysGluLeuGluTyrPheProGluThrAspLysValTrpIleGluIleGlyGluThr
 3490 3500 3510 3520 3530
 GAAGGAACATTTTATCGTGACACGCGTGAATTAATCTCTTATGGAGGAATAGTCTCATGCAAACTCAGGTTT
 GluGlyThrPheIleValAspSerValGluLeuLeuMetGluGlu***

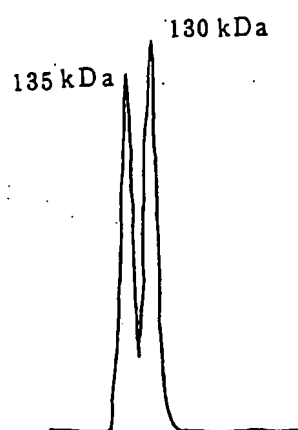
第 3 図



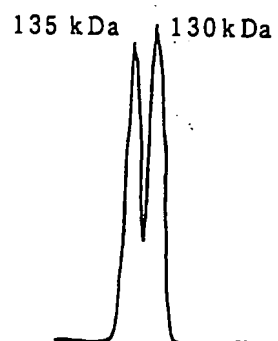
第4図



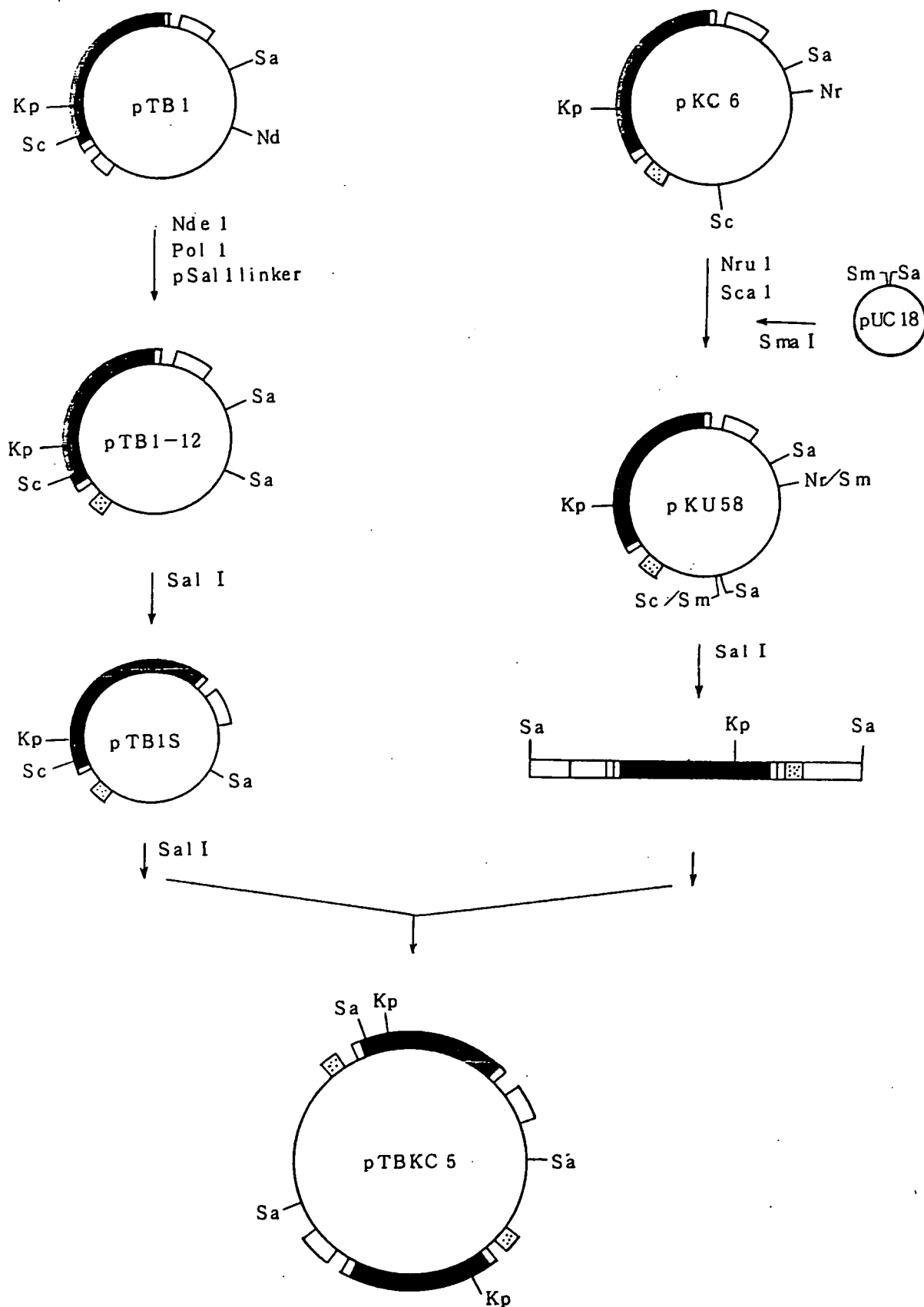
第 5 図



第 7 図



第 6 図



第1頁の続き

⑤Int.Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 15/00
 C 12 R 1:07)
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:19)
 (C 12 P 21/02
 C 12 R 1:19)

- ⑫発明者 清水 将年 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
 内
- ⑫発明者 中村 啓子 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
 内
- ⑫発明者 高田 容司 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
 内
- ⑫発明者 三木谷 研一 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
 内
- ⑫発明者 大川 秀郎 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
 内